

図4. 単発の内向き単相矩形パルス刺激に対するVC応答
 a-e: 刺激 16 ms 後の応答イメージ。刺激強度はそれぞれ $0.3 \text{ ms} \times 800 \mu\text{A}$, $0.3 \text{ ms} \times 500 \mu\text{A}$, $0.3 \text{ ms} \times 350 \mu\text{A}$, $0.3 \text{ ms} \times 200 \mu\text{A}$, $0.5 \text{ ms} \times 800 \mu\text{A}$ 。f は応答の中心部における蛍光強度変化比の時間経過。イメージの左は皮質吻側、上は外側にあたる。

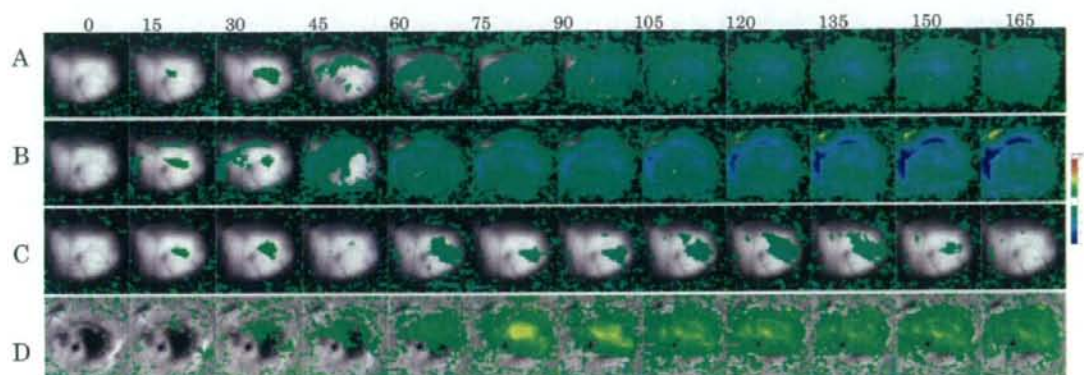


図5. 2点刺激に対する空間的加重効果の解析例

各行は刺激時点～刺激165 ms後まで15 ms毎のVC応答を左から並べたもの。刺激は内向き単相矩形波パルス電流 ($0.3 \text{ ms} \times 350 \mu\text{A}$) で、VCはRH1691で染色した。A)一点刺激、B) Aの部位より1 mm背側部を刺激、C) Aの刺激50 ms後にBへの刺激を組み合わせた。D) CとAの差分。イメージの左は皮質吻側、上は外側にあたる。

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

人工視覚システムの急性臨床試験の結果と術前の経角膜電気刺激
による網膜内層機能の評価の検討

分担研究者 不二門尚 大阪大学医学系研究科感覚機能形成学 教授
研究協力者 森本 壮 大阪大学医学系研究科眼科学 医師

研究要旨

人工視覚の適応を決める上で、残存する網膜の内層機能を評価することが人工視覚によって患者の視機能が回復するために重要である。これまで我々は経角膜電気刺激を用いて網膜色素変性症患者の網膜内層機能を評価する方法を考案した。今回、この経角膜電気刺激法を用いて人工視覚試験の被検者4名を検査しその検査の結果と臨床試験の結果について比較検討した。結果 TES 検査の結果が良好だった患者は臨床試験の結果も良好であった。このことから TES 検査は人工視覚の適応患者を選択するのに有用な方法であると考えられる。

A. 研究目的

網膜刺激型人工視覚では、網膜色素変性症（RP）の患者の眼内あるいは眼外に刺激電極を埋植して患者の網膜内層細胞を電気刺激して視覚を再建させる。このため網膜刺激型人工視覚が成功するためにはRP患者の網膜内層機能が残存している必要がある。しかしながら従来の眼科検査（視力、視野、網膜電位図）では、視細胞が残存していないと測定できず、視細胞がほぼ消失しているRP患者では測定できない。このため人工視覚の埋植の対象となるRP患者のうちどの患者が適応となるかを評価する方法がなく評価方法を開発する必要があった。そこで我々は経角膜電気刺激（TES）によって健常者と同じくRP患者でも疑似光覚（フォスフェン）が生じることを利用してRP患者の網

膜内層機能を評価する方法を開発し報告した（Morimoto et al, 2007）。しかしながらこのフォスフェンを用いたTES検査は患者の自覚症状に頼るけんさであり実際にどの程度この検査が有用であるのか明らかではなかった。これまでに我々は、脈絡膜上経網膜電気刺激（STS）方式の人工視覚システムの急性臨床試験を4名のRP患者に行っていた。今回、4名のRP患者に対してTES検査の結果と急性臨床試験の結果を比較してTES検査の有用性について検討した。

B. 対象と方法

I.

対象：大阪大学附属病院眼科にて人工視覚急性臨床試験を行ったRP患者4例4眼。男性2例2眼、女性2例2眼で年齢59歳から65歳（中

央値65歳)、視力は光覚弁から手動弁であった。

方法：①TES検査

被検査眼にペノキシール点眼薬にて麻酔を表面麻酔を行いついでビスコートで角膜表面を覆い図1Aの如く刺激用コンタクトレンズ電極(ビュリアンアレン型)を装着し、図1Bの刺激装置に接続し電気刺激を行った。刺激条件は、両相矩形波でパルス幅が10ms、刺激頻度は20Hz、パルス数は20発で電流強度を50 μ Aから最大2.8mAまで変化させた。検査項目は、最初にフォスフェンを感じた時の電流閾値(フォスフェン閾値)、フォスフェンが視野の中心にまで広がった時の電流閾値(中心フォスフェン閾値)、フォスフェンの位置を電気刺激ごとに患者に聞いて記録した。

②STS急性臨床試験

局所麻酔(キシロカイン注射)および静脈麻酔(フェンタネスト)をいった後、黄斑付近の強膜を半層切開し網膜刺激電極(9極多点電極)を埋植し、硝子体電極を挿入し電気刺激を行った。電気刺激の条件は両相矩形波でパルス幅1ms、インターパルス0.5msで刺激頻度は20Hz、パルス数は10発で電流強度を100 μ Aから1mAまで変化させ、各電極ごとに刺激し各電極毎のフォスフェンの電流閾値、フォスフェンの位置を患者に答えてもらい記録した。

C. 結果

1. 症例提示

症例1を提示する。59歳男性 視力は手動弁。TES検査では図2Aのように視野の中心より鼻側に最初のフォスフェンが生じフォスフェンの閾値は400 μ Aで、中心閾値は900 μ Aであった。図2Bのように埋植した電極

と各電極毎に対応したフォスフェンの位置の関係が得られた。

電極4がもっともフォスフェンの閾値が低く400 μ Aでその電極の周囲の1, 2, 7番の閾値も低く500 μ Aでそれらの電極の位置とフォスフェンが対応していた。一方、閾値が1mAであった3番と6番の電極はフォスフェンの位置も実際の電極の位置から離れていた。8番の電極はまったく反応がなかったが9極のうち8極の電極で反応が得られた。

症例2は65歳女性 視力は光覚弁。図2CのようにTES検査ではフォスフェン閾値は1.3mAで上方にフォスフェンが局限し2.8mAまで上げてもフォスフェンはほとんど広がらなかった。図2DのようにSTS試験でも1極ではフォスフェンが得られず1, 2, 3番の電極、あるいは1, 4, 7番の電極を同時に1mAの電流で刺激して広いフォスフェンが得られた。フォスフェンの場所は電極から離れた位置にあった。

2. TESとSTSのフォスフェンの位置関係

図3に4症例のTESによるフォスフェンの位置とSTSによるフォスフェンの位置を示す。全症例でTESでフォスフェンの位置とSTSで得られたフォスフェンの位置は同じ方向であった。

3. TESとSTSのフォスフェンの閾値の関係

TESのフォスフェン閾値、中心閾値とSTSで反応が得られた電極のうち閾値が一番低かった電極との関連について検討した。

図4のようにTESのフォスフェン閾値、中心閾値とSTSの閾値に関連はみられなかった。

4. TESの閾値とSTSで反応が得られた電極数の関係

TESのフォスフェンの閾値とSTSでの反応が得られた電極数との関連について検討した。

図5のようにフォスフェン閾値、中心閾値ともに低いほど反応が得られた電極数が多い傾向があった。

D. 考察

今回の検討の結果TESでフォスフェン閾値、中心フォスフェン閾値が低いほどSTSで反応が得られた電極の数も多かった。このことからフォスフェン閾値が低いほどより広範囲に網膜内層機能が残存していると考えられTES検査は人工視覚の埋植患者の適応を決めるための網膜内層機能の評価法として有用であると考えられる。ただしフォスフェンの位置を正確に同定する方法を確立させる必要がある。

E. 結論

フォスフェンの位置の同定など課題はあるもののTES検査はRP患者の網膜内層機能の評価しSTSの埋植患者を決めるための方法として有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitaguchi Y, Bessho K, Yamaguchi T, Nakazawa N, Mihashi T, Fujikado T.

In vivo measurements of cone photoreceptor spacing in myopic eyes from images obtained by an adaptive optics fundus camera.

Jpn J Ophthalmol. 2007 Nov-Dec;51(6):456-61

Kitaguchi Y, Fujikado T, Bessho K, Sakaguchi H, Gomi F, Yamaguchi T, Nakazawa N, Mihashi T, Tano Y.

Adaptive Optics Fundus Camera to Examine Localized Changes in the Photoreceptor Layer of the Fovea.

Ophthalmology. 2008 Oct;115(10):1771-7.

OPTICAL REVIEW Vol. 15, No. 3 (2008)

Adaptive Optics Fundus Camera Using a Liquid Crystal Phase Modulator

山口達夫、中澤直樹、別所建一郎、北口善之、前田直之、不二門尚、三橋俊文

2. 学会発表

第112回日本眼科学会(2008年4月17日~20日 横浜市)

補償光学眼底カメラの画像に残存収差および網膜形態が及ぼす影響

北口善之、不二門尚、別所建一郎、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、前田直之、田野保雄

2008 ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, April 30th, 2008, Fort Lauderdale, Florida, U.S.A

Reduced photoreceptor thickness causes blur of photoreceptor mosaic in the image by flood-illumination adaptive optics fundus camera.

Yoshiyuki KitaguchiA, Takashi FujikadoA, Kenichiro BesshoC, Tatsuo YamaguchiD, Naoki NakazawaD, Yoko

HiroharaD, Toshifumi MihashiD, Naoyuki MaedaB, Yasuo TanoB

第 33 回日本小児眼科学会 (2008 年 7 月 4 日～5 日 東京都品川区)

小児の外傷性視神経症に対する経角膜電気刺激治療

北口善之、下條裕史、大川賀孝、松下賢治、森本壯、不二門尚、田野保雄

第 56 回日本臨床視覚電気生理学会 (2008 年 9 月 5 日～7 日 東京都千代田区)

補償光学眼底撮影で錐体の配列異常が示された Occult macular dystrophy の一例

北口善之、不二門尚、別所建一郎、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、前田直之、田野保雄

第 1 回眼科画像診断研究会 (2008 年 9 月 6 日 東京都千代田区)

補償光学眼底カメラを用いた Foveal microhole の解析

北口善之、山口達夫、広原洋子、三橋俊文、不二門尚

第 46 回日本神経眼科学会総会 新潟 平成 20 年 10 月 12 日

人工視覚急性臨床試験前の網膜色素変性症患者に対する経角膜電気刺激を用いた残存網膜内層機能の評価

森本壯、不二門尚、北口善之、下條裕史、西田健太郎、坂口裕和、瓶井資弘、田野保雄

第 62 回臨床眼科学会 (2008 年 10 月 23 日

～26 日 東京都)

チタンサファイアレーザー障害に対する、高解像度網膜イメージング

北口善之、不二門尚、日下俊二、山口達夫、中澤直樹、広原陽子、三橋俊文、前田直之、田野保雄

3. 原稿

「補償光学」

臨床眼科増刊号「網膜硝子体 update」、2008

「工業用レーザーによる網膜障害」

眼科プラクティス 26 巻、2008

図とその解説

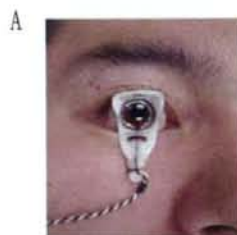


図 1 : TES 刺激電極 (A) と刺激装置 (B)

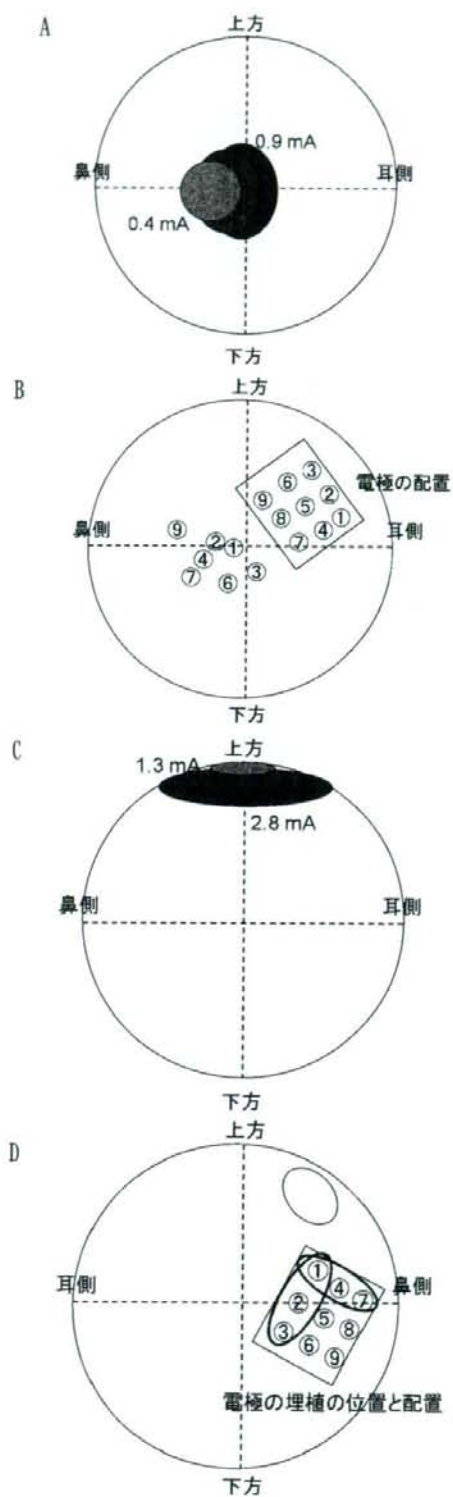


図2：症例1；TES のフォスフェン (A) と STS のフォスフェン (B)、症例2；TES のフォスフェン (C)、STS のフォスフェン (D)

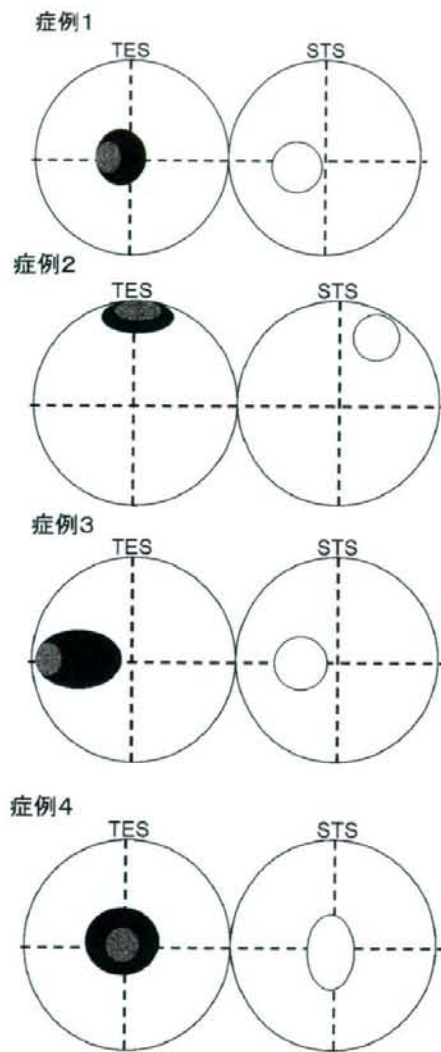
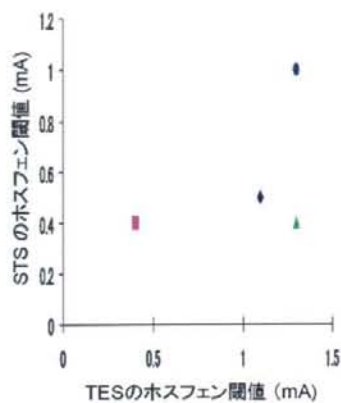


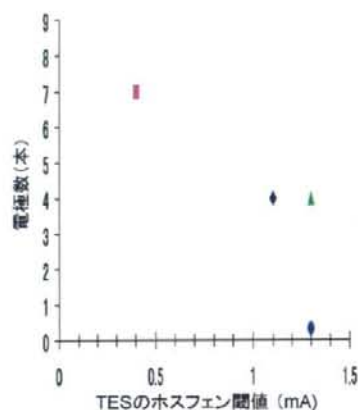
図3：TES と STS のフォスフェンの位置

薄い灰色の円：最初のホスフェンの位置、
 濃い灰色の円：中心ホスフェンの位置、
 白い円：STSのホスフェンの位置

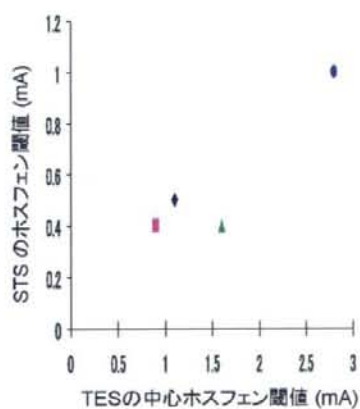
A



A



B



B

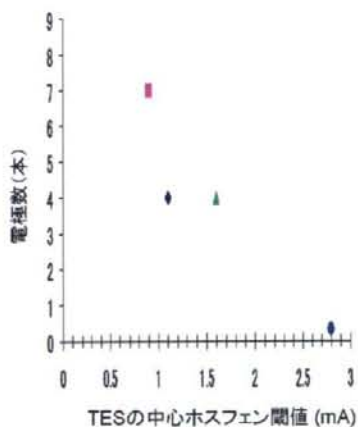


図4：STSのホスフェン閾値とTESのホスフェン閾値(A)とTESの中心ホスフェン閾値(B)

図5：TESのホスフェン閾値(A)、中心ホスフェン閾値(B)と電極数の関係

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書（H20 年度）

中型動物における視細胞障害モデルの作成

主任研究者 田野保雄 大阪大学医学系研究科眼科学 教授

分担研究者 大路 正人 滋賀医科大学眼科学 教授

研究協力者：瓶井 資弘、坂口 裕和、西田 健太郎（大阪大学医学系研究科眼科学）

研究要旨 これまでに有色家兎に対するベルテボルフィンと赤色 LED 光を用いた光障害モデルの作成を試み、広範囲に視細胞を選択的に障害することに成功した。また、この障害部位に STS 方式の刺激電極を埋植することにより、大脳皮質で電氣的誘発電位（EEP）を測定することに成功し、中型動物の視細胞障害モデルとしてこれまでに報告してきた。ただ、このモデルは脈絡膜循環が障害されており、脈絡膜循環で大部分が栄養されている家兎の場合は、長期的には網膜内層まで障害される可能性があった。そこで、今回、このモデルの照射後 1 年の長期経過をみるとともに、ヒト埋植用と同型の刺激電極を埋植し、刺激パラメーターを変化させて、有効な条件を検討した。その結果、照射後 1 年を経過しても、神経節細胞は温存され、EEP を誘発することができた。また、刺激パルスパラメーターを変化させた場合、biphasic pulse の刺激電流では、anodic first、cathodic first いずれを用いた場合でも閾値は大きく変わらなかった。今回の結果から、有色家兎に対してベルテボルフィンと赤色 LED を用いた光照射で作成される視細胞障害モデルが、照射後 1 カ月から 1 年後まで人工視覚の実験のための貴重な疾患モデルとして使用しうること、及び、このモデルが視細胞層障害モデルの刺激パラメーター検索に有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

有効な治療法のない網膜変性疾患に対して、本邦独自の人工網膜である、脈絡膜上経網膜電気刺激（STS）方式を開発した。動物実験に引き続き、急性臨床試験を行い、失明した患者に擬似光覚が得られることを確認した。今後の臨床応用にあたって、最適な刺激パラメーターを決定するために、健常な動物ではなく、適応患者と類似した視細胞変性モデルが必要となってくる。

これまで、マウス、イヌ、ブタなどの視

細胞変性モデルが報告されている。我々もマウスを使用した研究を行ってきたが、眼球が小さすぎるため、臨床応用のための多極チャンネルを有する刺激電極を埋設する実験に適していない。中型動物の網膜変性イヌやブタは海外の研究施設で開発、系統維持されており、入手が困難であるうえに、飼育条件を満たした研究施設の問題が残る。

そこで、これまで中型実験動物として扱いやすく、実験にも適していると考えられる有色家兎を用いて、ベルテボルフィンと赤

色 LED を用いた光障害モデルの作成を試みてきた。もともと、ラットやマウスの光障害モデルの研究は多く、その障害のされ方が網膜色素変性症と類似していると報告されている。しかしながら、家兎の場合、ラットやマウスと比較すると非常に光に対しての耐性が強靱であり、同じような条件では視細胞の障害は起こらないことが知られている。一方で、光感受性物質であるベルテポルフィンを用いたサルの実験で、視細胞を中心とした網膜外層が選択的に障害されることが報告されている¹⁾。そこで光照射とベルテポルフィンを用いることにより、視細胞障害が出来ないか検討し、末期の網膜色素変性患者の網膜組織で見られるような視細胞障害²⁾を生じること成功した。また、このモデルにおいて STS 方式の電極で、大脳皮質で誘発電位 (EEP) を誘導することにも成功し、このモデルが中型動物の視細胞障害モデルとして有用であるとこれまで報告してきた。しかし、このモデルでは脈絡膜循環が障害されており、脈絡膜循環により網膜の大部分が栄養されている家兎の場合、長期的には障害は網膜外層にとどまらず、網膜内層まで障害される可能性があった。これまでは、照射後 1 カ月のみ検討してきたが、今回は、このモデルの照射後 1 年の長期経過を観察し、視細胞障害モデルとして使用しうるか検討した。また、このモデルにヒト埋植用と同型の刺激電極を埋植し、刺激パラメーターを変化させて、有効な条件を検討した。

B. 対象と方法

対象：有色家兎 (n=4)

方法：有色家兎 (2.0-2.2kg) を 0.5% トロピカミド・5% フェニレフリンにて散瞳し、持続

点滴 (2cc/h、ケタラール:キシラジン=2:1) を用いて麻酔を行ったうえで、ベルテポルフィンを静脈投与し (0.47mg/kg)、5 分後より赤色 LED 光源 (MCEP-CR8 MORITEX 社製、1cm:9.5mW/cm² 図1) を眼前 (角膜頂点より 1mm 程度) に固定し、3 方向に対して合計 90 分間照射を行った。

照射前、照射後 1 カ月、6 カ月、1 年に、眼底写真、蛍光眼底造影検査、網膜電図 (全視野 ERG) を測定し、照射後 1 年の時点で照射部位に STS 方式の刺激電極を埋植し、大脳皮質で EEP を測定した。その後、眼球摘出を行い、4% パラホルムアルデヒドにて 24 時間固定し、凍結切片を作成し、HE 染色を行った。

(倫理面への配慮)

ARVO 動物実験の規定に準じて動物を取り扱い、最小限の苦痛で実験を行なった。

C. 研究結果

照射後 1 カ月の時点で、眼底写真では Visual Streak を含む広範囲に網脈絡膜変性が認められ (図1)、1 年以上経過しても範囲は変化しなかった。蛍光眼底造影検査でも、その変性部位に一致した低蛍光な像が見られ、経時的に脈絡膜毛細血管の循環障害が増強していた。(図2)。また、1 ヶ月後の全視野 ERG では、a 波、b 波とも振幅が有意に減弱しものの、1 年以上経過すると振幅は少し回復し、有意差を認めなかった (図3)。また、照射後 1 年経過しても、照射部位に STS 方式の刺激電極を埋植して電気刺激を行うことにより、EEP を誘発することに成功した (図4)。Biphasic pulse を用いた場合は、anodic first を用いた場合と、cathodic first を用いた場合の閾値に有意差を認めなかった (表1)。照射後 1 年以上経過した照射部位での組織標本では、視細胞層を含む網膜外層が消失し、内顆粒層の細胞数は照射後 1 カ月よりも有意に減

少していたが(図5)、神経節細胞の数に有意差を認めなかった(表2)。

D. 考察

我々が作成した視細胞障害モデルは、ベルテポルフィンと赤色 LED を用いるため脈絡膜循環が障害される。家兎の場合は、網膜内層も脈絡膜循環で栄養されているために、照射後長期間経過を見た場合は、網膜内層まで障害されることが危惧される。今回、照射後1年以上経過をみたところ、実際に経時的に脈絡膜毛細血管板の閉塞を認め、内顆粒層の細胞数も1カ月後よりも1年後の方が有意に減少していた。しかし、神経節細胞数は有意に変化せず、照射後1年でも障害部位に STS 方式の刺激電極を埋植して電気刺激を行うことにより、EEP を誘発することができた。したがって、このモデルが照射後1カ月から少なくとも1年は、視細胞障害モデルとして使用しうると考えられた。

家兎は網膜内層が脈絡膜循環により栄養されていると考えられるが、もともと正常眼でも硝子体腔内と神経節細胞層との酸素濃度がほとんど変わらないことや、神経節細胞の酸素消費なども視細胞に比べて10分の1程度と少ないため³⁻⁴⁾、例え脈絡膜循環が障害されても、神経節細胞層は急激な影響は受けにくく、照射後1年は少なくとも神経節細胞が減少することなく持ちこたえられるのではないかと考えられた。逆に、内顆粒層は神経節細胞層より比較的脈絡膜循環に栄養される比率が高いために、照射後1年で細胞数が減少するのではないかと考えられた。

また、このモデルにおいて biphasic pulse を用いた STS 方式の電気刺激を行っ

た結果、anodic first でも cathodic first でも閾値に有意差を認めなかった。このことから、この STS 方式を臨床応用する際に、biphasic pulse を用いる場合は、anodic first と cathodic first の閾値の観点からでは、いずれも刺激パラメーターとして使用しうると考えられた。

E. 結論

今回我々は、ベルテポルフィンと赤色 LED を用いた有色家兎の視細胞障害モデルの照射後1年以上経過観察し、経時的に脈絡膜循環障害や内顆粒層の細胞数の有意な減少を認めたが、神経節細胞は温存され、STS 方式の刺激電極で EEP を誘発できることを確認し、このモデルが照射後1カ月から少なくとも1年は視細胞障害モデルとして使用しうるとを示した。また、このモデルを用いた刺激パラメーターの比較では、biphasic pulse では、anodic first と cathodic first の間に閾値の有意差はなく、このモデルが刺激パラメーターの検索に有用であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

1, K. Nishida, M. Kamei, M. Kondo, T. Sakai, Z. Du, Y. Kitaguchi, H. Sakaguchi, T. Fujikado, Y. Tano

[Suprachoroidal-Transretinal Stimulation (STS) Generates EEP In a Middle-Sized Animal Model of Retinal Degeneration] ARVO, 2008

2, 西田健太郎, 瓶井資弘, 近藤峰生, 坂口裕和, 不二門尚, 田野保雄 [中型動物にお

ける視細胞障害モデルの作成] 第112回
日本眼科学会総会 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

{参考文献}

1、 Reinke MH, et al. Verteporfin photodynamic therapy retreatment of normal retina and choroid in the cynomolgus monkey. *Ophthalmology* 1999; 106:1915-1923

2、 Santos, et al. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric Analysis. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115: 511-515

3、 Yu DY, et al. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 2001;20:175-208

4、 Yu DY, et al. Low oxygen consumption in the inner retina of the visual streak of the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H419-H423

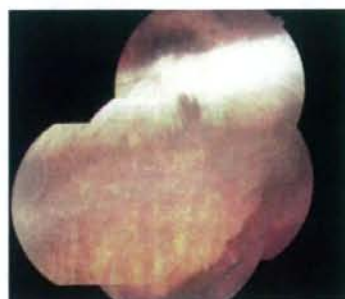


図1. 上から照射前、照射後1、6、12か月の眼底写真。Visual Streakを含む広範囲に網脈絡膜変性を認めるが、経時的に変性部位の拡大及び縮小は認めない



図2. 上から照射前、照射後1、6、12カ月の蛍光眼底造影。図1の網脈絡膜変性に一致した範囲に低蛍光がみられ、経時的

に脈絡膜毛細血管の循環障害が進行している。

Amplitude(μ V)	照射前	照射後1カ月	照射後6カ月	照射後1年
a-wave	64.2 \pm 10.7	43.6 \pm 9.8	42.0 \pm 2.0	49.0 \pm 1.3
p*		P=0.013	P=0.019	P=0.086
b-wave	172.7 \pm 37.2	123.8 \pm 8.7	153.0 \pm 7.8	156.3 \pm 2.5
p*		P=0.05	P=0.841	P=1

図3. 照射前と照射後1、6、12カ月の全視野ERG。照射後1カ月でa波、b波ともに3分の2程度に減弱し、その後b波はやや改善した。

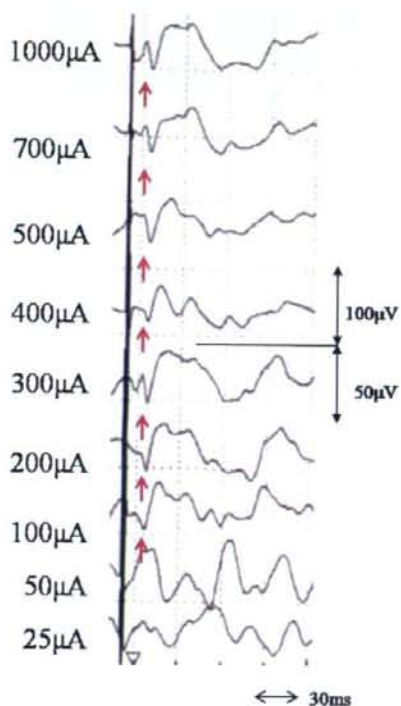


図4. 照射後1年の照射眼に対するSTSによる電気刺激で、EEPが誘発された(矢印)。刺激条件は、Biphasic cathodic first duration 500 μ s。


	#10 照射眼	#15 照射眼	#16 照射眼	#17 照射眼
	100μA	200μA	500μA	300μA
	100μA	200μA	700μA	400μA

表1 biphasic pulse を用いて刺激した場合のそれぞれの閾値（上が anodic first、下が cathodic first で、有意差を認めない $P>0.05$ ）



図5. 照射後1年の照射部位の組織切片。外顆粒層が消失しているものの、内顆粒層、神経節細胞層は維持されている。

	ONL	INL	GCL
control	475.8±84.9	186.0±31.2	14.8±3.9
照射後1カ月	7.0±10.3	105.6±31.1	12.5±3.8
照射後1年	0	69.3±32.4	14.4±3.3
P*	P*<0.001	P*$=0.006$	P* $=0.317$

*Mann-whitney's U test

表2 正常眼、照射後1カ月、1年の照射部位の網膜の細胞数。ONL、INLとも有意に減少するものの、GCLは有意な変化を認めなかった。

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

視細胞変性の中型モデル動物の作成に関する研究
（トランスジェニックウサギの網膜変性過程の層別解析）

研究分担者 近藤 峰生（名古屋大学大学院医学系研究科感覚器障害制御学 准教授）

研究要旨 我々は人工視覚の移植実験に有用な中型動物の視細胞変性モデルとして、ロドプシン P347L トランスジェニック (Tg) ウサギの作成を試み、その結果世界で初めて網膜変性 Tg ウサギの作出に成功した (Kondo et al. IOVS, in press)。本年度の目的は、この Tg ウサギの視細胞変性のメカニズムを解明すること、および網膜電図 (ERG) の層別解析によって各週齢における網膜各層の障害の程度を明らかにすることである。電子顕微鏡による視細胞の観察によって、Tg ウサギの視細胞間には多数の小嚢 (vesicle) が存在することがわかった。この小嚢は内節からちぎれるように産生されており、同じ遺伝子異常の Tg マウスの所見との類似性により変異ロドプシンの外節への輸送が障害されている可能性が示唆された。また ERG 解析の結果から、Tg ウサギの視細胞が重度に障害されている時期でも網膜内層機能は十分に保存されていることがわかった。以上の結果から、我々の作成した Tg ウサギは人工視覚の移植実験に理想的な動物モデルであることが示された。

A. 研究目的

これまでに我々は、人工視覚の移植実験に適した中型動物の視細胞変性モデルとして、ロドプシン遺伝子変異 (Pro347Lau) をウサギ遺伝子に導入したトランスジェニックウサギ (Tg ウサギ) の作成を試みてきた。昨年度の段階では、安定して視細胞変性がおこるラインを樹立し (ライン 7)、眼底検査、変異遺伝子の発現定量、網膜組織切片、および網膜電図 (ERG) によって、我々の Tg ウサギが確かに進行性の視細胞変性をおこすことを報告した。しかしながら、このウサギの視細胞変性のメカニズムは不明であり、また網膜の各層の変性の様式についても調べていなかった。この動物モデルが国際的な動物モデルとして確立されるためには、上記の 2 点についてさらに細かく組織

学および電気生理学的に研究を詰めておくことが必要である。

本年度の研究の目的は以下の 2 つである。
(1) Tg ウサギの電子顕微鏡所見を研究し、進行性に視細胞が変性していくメカニズムを調べること。(2) Tg ウサギの ERG を詳細に調べて網膜の層別機能解析を行ない、視細胞層が重度に障害されても中層や内層の機能が保たれた状態であること、つまり人工視覚の移植実験に適した動物モデルであることを証明すること、である。本年度の成果は、世界で初めてのウサギの視細胞変性動物モデル作成の成功例として眼科の国際誌、Investigative Ophthalmology & Visual Science に受理され、本年度の国際学会 (International Congress of Eye Research) のシンポジウムで報告された。

B. 研究方法

今回の研究には、生後6週から48週のNZWウサギ64匹を用いた(野生型ウサギ32匹、Tgウサギ32匹)。

視細胞の電子顕微鏡による観察では、生後6週のウサギの網膜を用いた。2.5%のグルタルアルデヒドで2時間固定後にさらに1%オスミウム溶液で2時間固定した。エタノールで段階的に脱水し、エポキシ包埋後にultramicrotomeにて超薄切片を作製し、電子顕微鏡で観察した。

電気生理学的なTgの網膜層別解析に関しては、数式fittingを用いた。視細胞応答であるa波の解析には、Hood & Birchのfitting式(HOVS, 1994, 図1)を用いた。

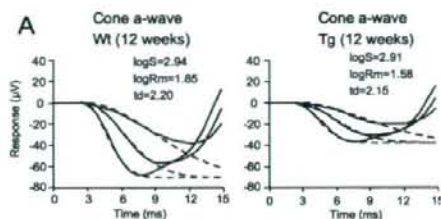


図1. 視細胞応答(a-wave) fitting解析

b波のフィッティングには、Naka-Rushton & Fultonの式を用いた(Vision Res, 1978, 図2)。

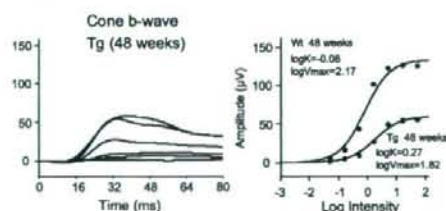


図2. TgウサギのERGにおけるb波解析のための、Naka-Rushton式フィッティング
また律動様小波の解析は、a波を差し引き

したあとの成分(P2)をフーリエ解析で周波数分析し、85-300 Hzの成分のみを抽出した(図3)。

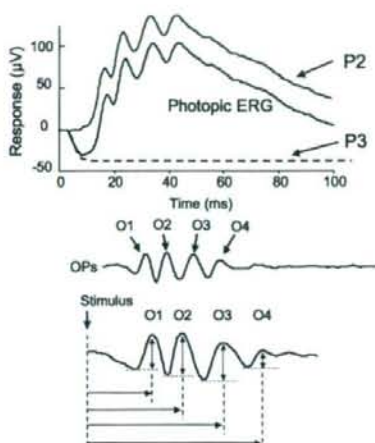


図3. 原波形からa波(P3)をさし抜き、その後に85-300 Hzの成分のみを抽出して、律動様小波を得る方法

(倫理面への配慮)

今回の研究は、名古屋大学医学部の実験動物委員会の承認の下で行なった。動物の苦痛は最小限とし、ARVOの動物実験取り扱い規約を遵守した。

C. 研究結果

Tgウサギの視細胞の電子顕微鏡での観察では生後6週のウサギ網膜を用いた。この時点では、視細胞の外節はまだよく保たれていた。興味深い所見は、Tgの視細胞の間に多数の小囊(vesicle)の沈着がみられたことであった。この沈着物はすべて1層の膜に包まれており、大きさは、直径50-300 nm程度のものであった。さらに高倍率で観察すると、このvesicleは視細胞の内節からちぎれるように産生されていることがわ

かった。内節から産生されて視細胞の間隙を埋め尽くしているこの物質の存在が Tg ウサギの視細胞死に関与している可能性が考えられた。

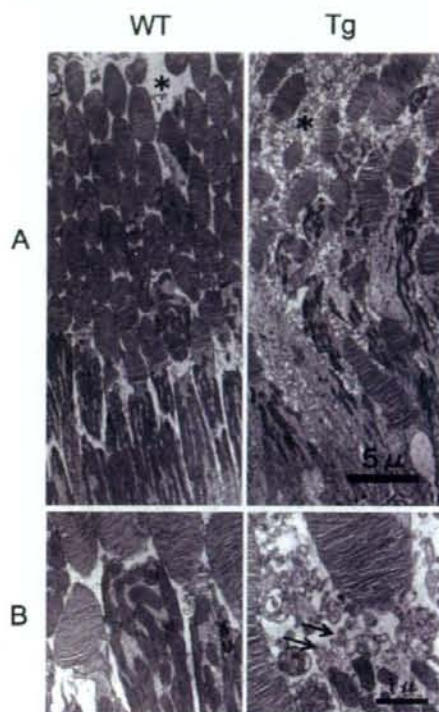


図4. 野生型ウサギ(左)とTgウサギ(右)の視細胞の電子顕微鏡所見。Tgの視細胞間には多数の小嚢(vesicle、*印)で埋め尽くされており、これらは視細胞の内節からちぎれるようにして産生されていることがわかった。

さらに我々は、詳細なERG解析によって、Tgウサギの網膜の外層、中層、内層の機能が週齢とともにどのように変化していくのかを調べた。その結果、最も障害が強いのがa波(視細胞電位)で、次にb波(双極細胞電位)であり、網膜内層電位である律動様小波は48週の時点でも比較的良好に保

たれていることがわかった(図5)。

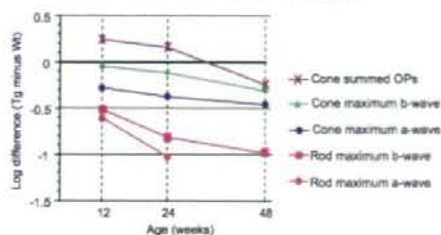


図5. Tgウサギの錐体系および杆体系の網膜各層の電位(a波、b波、および律動様小波)の振幅の週齢による変化。縦軸において、0が野生型ウサギの振幅と等しいことを示し、下にいくほど振幅が野生型よりも減弱していることを示す。

図5で示したように、例えば生後48週の時点では、杆体a波は $10\mu\text{V}$ 以下にまで減弱しておりフィッティングが不可能な状態であった。その振幅は野生型ウサギより1 log以上低下している。杆体b波もおおよそ1 logの低下である。一方で錐体a波はこの時点で0.5 logの低下、錐体b波は0.3 logの低下にとどまっている。錐体系の内層電位である律動様小波は、生後12週と24週ではむしろ正常よりも電位が大きいという興味深い現象もみられた(図6)

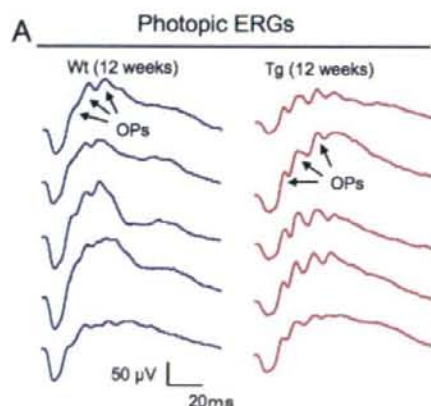


図 6. 野生型 (WT) と Tg ウサギの生後 12 週における律動様小波 (OPs, 矢印)。この時点では明らかに Tg の方が野生型よりも OPs の振幅が大きい。

D. 考察

今回の研究の結果から、我々の作成した Tg ウサギの視細胞間隙には多数の小嚢が存在することがわかった。この小嚢は内節からちぎれるようにして次々と産生され、やがて視細胞同士の間隙を埋め尽くしていくようであった。光学顕微鏡所見では Tg の網膜の外節部位に HE 染色でよく染まる物質が観察されたが、これが今回電子顕微鏡で観察された小嚢と一致することもわかった。

今回の Tg ウサギの遺伝子変異はロドプシン遺伝子の C 末端付近にある。この部位は産生されたロドプシンが視細胞の外節に輸送される際に重要な役割を果たしていると言われており、実際に同じ部位に遺伝子異常がある Tg マウスでも同様の所見が報告されている (Li et al. PNAS, 1996)。彼らは免疫組織電顕も行っており、この小嚢の中に実際に変異ロドプシンが詰まっていることを証明している。我々の今回の Tg では小嚢の中味が実際に変異ロドプシンであるかどうかは証明していないが、変異部位が同じであることと、電子顕微鏡所見の類似により、我々の Tg ウサギの視細胞の変性メカニズムとして変異ロドプシンが正常に外説に輸送されずに内節に蓄積してそこからちぎれて細胞間に蓄積し、その蓄積物質の毒性によって視細胞死がおこるといった可能性が示唆された。

また、詳細な ERG の層別解析によって、

Tg ウサギの各層が各週齢でどの程度障害されているかがわかった。予想通り杆体系の細胞群は錐体系細胞群よりも速く変性し、重度に障害され、また視細胞応答が最も障害され、内層電位である律動様小波 (OPs) は最もよく保存されていることがわかった。

この結果は、この Tg ウサギの視細胞が全て変性して失明したとしても網膜内層機能はまだ十分に保存されている可能性を示しており、今回我々が作製した Tg ウサギが人工視覚の移植実験に理想的な動物モデルであることが証明された。

また、非常に興味深い現象として、Tg ウサギでは生後 12-24 週の変性早期の時点では、網膜内層電位である律動様小波の電位が正常より大きく (=super-normal) なっていることがわかった。現時点でこの現象のメカニズムは不明であるが、視細胞が進行性に変性していくことに伴って生ずる、網膜内層の代償的 remodeling (Marc et al. Prog Retin Eye Res, 2003) がおきている可能性があると考えられた。現在は人工網膜の移植実験と並行して免疫組織や電気生理学的実験、薬理学的実験によってこの現象の機序についても研究を進めている (Sakai, Kondo, et al. Submitted) .

E. 結論

今回の研究によって、我々の作製した Tg ウサギが進行性の網膜変性をおこし、その細胞死の原因として変異ロドプシンの外節への輸送障害が関与している可能性が示唆された。

また詳細な ERG 解析によって、視細胞の機能が著しく障害された時点でも、網膜の中層や内層の機能は 50%程度残存しているこ

とがわかった。この結果により、我々の Tg ウサギは人工視覚の移植に用いる中型動物モデルとして理想的なものであることが証明された。

次年度ではこの Tg ウサギに我々の研究班が開発した STS 型人工視覚を移植して電気刺激を行ない、視覚野の応答を計測する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kondo M, Sakai T, et al. Generation of a transgenic rabbit model of retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. in press.

2) Sugita S, Kondo M, et al. Correlation between macular volume and focal macular electroretinogram in patients with retinitis pigmentosa. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:3551-3558.

3) Kondo M, Kurimoto Y, et al. Recording focal macular photopic negative response (PhNR) from monkeys. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49:3544-50.

2. 学会発表

1) Kondo M, Ikenoya K, et al. Preservation of macular oscillatory potentials in eyes with retinitis pigmentosa with normal visual acuity. Visual Neuroscience Symposium. 18th International Congress for Eye Research. Beijing, China, September 28, 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

I. 参考文献

1) Li T, Snyder WK, et al. Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments. Proc Natl Acad Sci USA.

1996;93:14176-14181.

2) Tan E, Wang Q, Quiambao AB, et al. The relationship between opsin overexpression and photoreceptor degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42:589-600.

3) Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. Prog Retin Eye Res. 2003;22:607-655.

網膜下刺激電極の開発

分担研究者 太田 淳 奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科 教授

研究要旨

高精細な網膜刺激型人工視覚システム実現を目的として、分散型刺激電極方式の網膜下への適用について研究を行った。昨年度までに開発した分散型刺激デバイスと整合性がある光アドレス型マイクロチップを開発し、包埋実装を行い埋込型デバイスを完成させた。

A. 研究目的

本研究の目的は、脈絡膜上経網膜刺激 (STS: Suprachoroidal Transretinal Stimulation) や網膜下刺激に適した高密度実装を目指した分散型電極アレイの実装方式の開発である。

今年度は、これまで基本動作実証を行った分散型電極アレイを網膜下に適用するためのデバイス構造等の検討を目的とした。

B. 実験方法

本研究では、昨年度試作した分散型電極アレイをもとに、網膜下埋植への適用を目指して光応答型分散型電極アレイの設計と試作を行った。そして、ウサギ *in vivo* 電気刺激実験において試作したデバイスの機能実証を行った。

[光応答型分散型刺激デバイス設計と試作]

本研究において提案された分散型アーキテクチャは、フレキシブル基板の上に小型の CMOS-LSI チップ (マイクロチップ) を複数配置してそれらをネットワーク接続することで少数配線での制御や刺激の高密度化およびフレキシビリティの向上を実現するものである。人工視覚デバイスには刺激電極の埋込み位置によって刺激方式が区別されており、昨年度までに実現したデバイス (以下、従来デバイスと表記する) では STS 方式が想定されていた。本研究では、受光機能を搭載することで網膜下刺激方式に対して互換性を有した実用性の高い人工視覚デバイスの実現を目指す。

図1は試作したマイクロチップ写真である。マイクロチップの大きさは $600\mu\text{m}$ 角で、従来開発したチップと同じ大きさとした。このマイクロチップを分散配置した刺激デバイスを試作した。1 個のマイクロチップ上には9 個の Pt バルク電極が搭載されている。図2は試作したデバイスの写真である。図に示すように兎眼球の曲率にフィットできる柔軟性を有している。

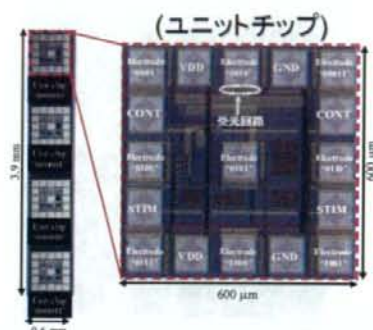


図1：試作した分散型人工視覚デバイス用マイクロチップの写真

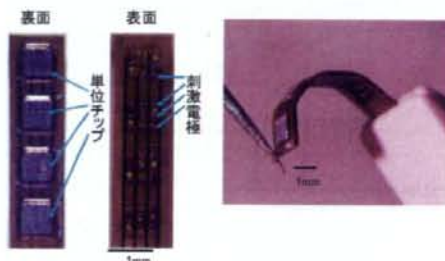


図2：試作した分散型人工視覚デバイス

[電流源内蔵型マイクロチップ]

また、従来デバイスは指定した刺激電極 1 極に対して刺激電流を外部より供給するといったシンプルな機能のみを有していた。しかし、正常な視覚が感じられるような画像情報を人工視覚デバイスで実現するためには複数電極での刺激が必要になると考えられているため、本研究において同時多点刺激機能の搭載を行う。それに伴い刺激信号をオンチップでも供給可能なように刺激電流の生成機能も搭載する。さらに眼球のような球体にもフィットする柔軟性を実現するため、マイクロチップを放射状に配置するデバイス形状を提案する。マイクロチップ間には設計段階で LSI 配線層を用いて接続しておくことで実装プロセス